



Isolation and characterization of raphanusanin-induced gene(s) in etiolated radish hypocotyls

著者	Moehninsi
内容記述	Thesis (Ph. D. in Biological Science)--University of Tsukuba, (A), no. 5031, 2009.3.25 Includes bibliographical references (leaves 115-133)
発行年	2009
URL	http://hdl.handle.net/2241/111311

氏 名 (国籍)	モーニンスィー (ミャンマー)		
学 位 の 種 類	博 士 (生物科学)		
学 位 記 番 号	博 甲 第 5031 号		
学位授与年月日	平成 21 年 3 月 25 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
審 査 研 究 科	生命環境科学研究科		
学 位 論 文 題 目	Isolation and Characterization of Raphanusanin-induced Gene(s) in Etiolated Radish Hypocotyls (ダイコン下胚軸からの Raphanusanin 誘導性遺伝子の単離と機能解明)		
主 査	筑波大学教授	農学博士	杉 浦 則 夫
副 査	筑波大学教授	工学博士	王 碧 昭
副 査	筑波大学准教授	理学博士	繁 森 英 幸
副 査	筑波大学准教授	博士 (理学)	小 野 道 之

論 文 の 内 容 の 要 旨

ラファヌサニンは、一方向からの青色光照射によって引き起こされるダイコン芽生えの下胚軸伸長抑制に関与する光誘導性成長抑制物質である。ラファヌサニンの生理的役割としては、下胚軸伸長の抑制、光屈性反応、微小管配向性の制御、頂芽優勢の解除などが知られているが、ラファヌサニンによる細胞レベルでの制御に関する分子メカニズムについては明らかにされていない。

本研究ではまず、改良型ディファレンシャル・ディスプレイ RT-PCR (DD-RT-PCR) 法を用いてラファヌサニン誘導性遺伝子をランダムに解析し、成長抑制に関連のある遺伝子を探索した。その結果、4つの候補遺伝子が同定され、このうちの3つは様々な環境刺激に応答する機能性タンパク質をコードする既知の遺伝子であった。残りの一つは下胚軸の伸長抑制に関与する可能性が高い因子であり、*RsCSN3*と命名した。ラファヌサニン処理の場合と同様に、*RsCSN3* 遺伝子の発現は光屈性刺激に対しても実際に伸長抑制が確認される刺激開始から数分以内に増加していた。つまり、この遺伝子は光誘導性の下胚軸伸長抑制に関与している可能性が示唆された。また、*RsCSN3* の転写レベルは青色光および緑色光照射、ならびにラファヌサニン処理開始から 60 分後には減少していることから、光屈性反応との機能的な関連も示唆された。

ラファヌサニンの機能的役割を理解するために、SSH (suppression subtractive hybridization) 法を用いてラファヌサニン誘導性遺伝子のライブラリーを作成した。得られた遺伝子オンロジー情報から、ライブラリーの約半数のクローンは様々な防御機構に共通する遺伝子、つまりプロテインキナーゼ、輸送体、プロテアソーム分解系関連、シグナル伝達系関連、加水分解酵素などであり、それらはラファヌサニンによって強く制御されていた。次に、種々の機能的カテゴリーに属する 50 個の EST クローンを選び、定量 RT-PCR による発現解析を行った。ラファヌサニン処理によって植物の防御応答に関与する数多くの遺伝子の発現が増加したことから、ラファヌサニンは同じ生物プロセスにおいて並行する複数の経路で機能する遺伝子の正の調節因子であることが示唆された。さらに、ラファヌサニンと青色光シグナル伝達系との機能的な関連性を明らかにするために、顕著に発現している 33 個の EST クローンについて様々なエネルギーの青色光に対する発現

解析を行った。これらの発現解析およびバイオインフォマティクスの手法を用いた解析は、光によって制御される自然免疫機構との関連が期待される多くの遺伝子の機能を明らかにできる。一方、シロイヌナズナ芽生えにラファヌサニンを処理したところ、その成長抑制効果は光依存的であった。明条件下では濃度依存的に芽生えの成長抑制が観察されたが、暗条件下では確認されなかった。

以上の結果より、ラファヌサニンが植物の光シグナル伝達系、防御応答、そして成長抑制といった幅広いプロセスに関与していることを明らかにした。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は、ダイコンの光屈性に関わる光誘導性成長抑制物質であるラファヌサニンの転写レベルでの制御に関わる因子を初めて網羅的に解析したものである。

まず、改良型 RT-PCR (DD-RT-PCR) 法を用いて、ラファヌサニン誘導性遺伝子をランダムに解析し、成長抑制に関連のある遺伝子としてを探索した結果、ダイコン下胚軸の伸長抑制に関与する遺伝子として *RsCSN3* を見出したことは評価に値する。

次に SSH 法を用いてラファヌサニン誘導性遺伝子のライブラリーを作成した結果、ライブラリーの約半数のクローンは様々な防御機構に共通する遺伝子であり、それらはラファヌサニンによって強く制御されていることを見出した。そこで、種々の機能的カテゴリーに属する EST クローンを選び、定量 RT-PCR による発現解析を行った結果、ラファヌサニンは、同じ生物プロセスにおいて並行する複数の経路で機能する遺伝子の正の調節因子であることが示唆された。さらに、ラファヌサニンと青色光シグナル伝達系との機能的な関連性を明らかにするために、顕著に発現している EST クローンについて様々なエネルギーの青色光に対する発現解析を行った。一方、シロイヌナズナ芽生えにラファヌサニンを処理したところ、その成長抑制効果は光依存的であることを見出した。以上の結果より、ラファヌサニンが植物の光シグナル伝達系、防御応答、そして成長抑制といった幅広いプロセスに関与していることを明らかにしたことは高く評価できる。

ラファヌサニンの作用メカニズムの解明は今後の課題であるが、分子生物学およびバイオインフォマティクスの手法を用いた本研究によって、ラファヌサニンのプログラム細胞死や光シグナル伝達系との関連性について興味深い知見が得られており、光を介した植物の防御応答における生理活性物質の作用メカニズムの解明に大きく寄与するものと期待される。

よって、著者は博士（生物科学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。